

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2001-157586
(P2001-157586A)

(43)公開日 平成13年6月12日(2001.6.12)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード*(参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 0 1 H 5/00	A 2 B 0 3 0
A 0 1 H 5/00		C 1 2 N 1/15	4 B 0 2 4
C 1 2 N 1/15		1/19	4 B 0 6 5
1/19		1/21	
1/21		15/00	ZNA A

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 28 頁) 最終頁に統く

(21)出願番号 特願平11-342347

(22)出願日 平成11年12月1日(1999.12.1)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成11年6月4日
日本農芸化学会東北支部発行の「日本農芸化学会東北支
部第130回例会受賞記念講演シンポジウム講演要旨N o.
1 (1999)」に発表

(71)出願人 390025793

岩手県

岩手県盛岡市内丸10番1号

(72)発明者 佐藤 利次

岩手県北上市幸町2-30 ヒーロー和野
202

(73)発明者 平野 達也

愛知県名古屋市天白区原4-1103 むつみ
ハイツ302号

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 純輔 (外1名)

最終頁に統く

(54)【発明の名称】 プロモーター遺伝子

(57)【要約】

【解決手段】 以下の(a)又は(b)に示される、プロモーターとして機能し得るDNAを提供する。(a)配列番号1で表される塩基配列を含むDNA。

(b)配列番号1で表される塩基配列において少なくとも1個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、かつプロモーター活性を有するDNA。

【効果】 本発明により、シイタケチロシナーゼ遺伝子の転写開始を指令するプロモーター、シイタケチロシナーゼ遺伝子の転写終結を指令するターミネーター、該プロモーター及び/又は該ターミネーターを含む組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、並びに該形質転換体を用いるポリペプチドの製造方法が提供される。

BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)又は(b)に示される、プロモーターとして機能し得るDNA。

(a) 配列番号1で表される塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号1で表される塩基配列において少なくとも1個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、かつプロモーター活性を有するDNA。

【請求項2】 請求項1記載の遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつプロモーター活性を有するDNA。

【請求項3】 以下の(c)又は(d)に示される、ターミネーターとして機能し得るDNA。

(c) 配列番号2で表される塩基配列を含むDNA。

(d) 配列番号2で表される塩基配列において少なくとも1個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、かつターミネーター活性を有するDNA。

【請求項4】 請求項3記載の遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつターミネーター活性を有するDNA。

【請求項5】 請求項1若しくは2記載のDNA及び/又は請求項3若しくは4記載のDNAを含有する発現用組換えベクター。

【請求項6】 請求項5記載の発現用組換えベクターに任意のポリペプチドをコードする遺伝子が組み込まれた組換えベクター。

【請求項7】 請求項5記載の発現用組換えベクターを含む形質転換体。

【請求項8】 請求項6記載の組換えベクターを含む形質転換体。

【請求項9】 請求項8記載の形質転換体を培養又は栽培し、得られる培養物又は栽培物からポリペプチドを採取することを特徴とする前記ポリペプチドの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、担子菌シイタケのチロシナーゼ遺伝子における転写開始を指令するプロモーター、シイタケチロシナーゼ遺伝子の転写終結を指令するターミネーター、並びに該プロモーター及び/又は該ターミネーターを含む組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、該形質転換体を用いるポリペプチドの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】近年の組換えDNA技術の進歩により、大腸菌、枯草菌、放線菌、酵母、糸状菌、動物細胞、植物細胞などの様々な細胞を宿主として用いる異種遺伝子発現用宿主ベクター系の開発が行われている。例えば、現在までに、大腸菌の宿主ベクター系を用いて、インシュリン、成長ホルモン、インターフェロンなどの様々な有用物質が生産されている。また、植物の育種においては、従来の古典的な交配法では不可能であった種を越え

ての異種生物由来の遺伝子導入が、アグロバクテリウム・チュメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のTiプラスミドなどの宿主ベクター系を用いることにより行われ、所望の性質を有するトランスジェニック植物が作出されている。

【0003】上記の宿主ベクター系のうち、現在までに最も多く実用化されているのは大腸菌の宿主ベクター系である。しかし、大腸菌を宿主として用い、ヒトなどの高等動物由来のポリペプチドを生産させた場合、生産されたポリペプチドに糖鎖が付加されないことやポリペプチド鎖が本来の高次構造にフォールディング (folding) されないことなどが原因で、元来の生理活性を示さないことが多い。さらに、大腸菌は目的ポリペプチドの生産過程において、該ポリペプチド以外にも様々な毒性物質を产生するため、多段階の精製過程を必要とするなどの問題点がある。

【0004】そこで、それらの問題を解決するため、糖鎖付加機能及び適正なフォールディング機能を有する宿主として、酵母細胞や動物細胞などの真核細胞を用いる宿主ベクター系の開発が行われてきた。しかし、酵母細胞を用いてヒトなどの高等動物由来のポリペプチドを生産させた場合、ヒト由来のものとは異なる高マンノース型の糖鎖が付加される場合があること、あるいは目的ポリペプチドの生産が低いことなどの問題点が挙げられる。一方、動物細胞を用いた場合であっても、目的産物の収量が極めて少ないとことや高価な培地を必要とするなどの問題点が多い。そのような観点から、高等動物細胞と同等の糖鎖が付加されかつ安価に培養でき、そして安全性が高いなどの要件を満たす宿主ベクター系が求められていた。ところで、担子菌は一般に酵母よりも動物に近縁である [T. L. Smith : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 7063 (1989)] ため、適正な糖鎖付加機能及び適正なフォールディング機能を有していると思われる。特に、シイタケ (*Lentinula edodes*) は、長年食用に用いられてきた実績もあり、安全性に優れている。

【0005】シイタケの属する食用担子菌の遺伝子工学的な処方による形質転換の技術開発は、これまで、Miranda D. らが、エレクトロポレーション法によるマッシュルームの形質転換 [Miranda D. van de Rhee, et.al., Mol.Gen.Genet., 250, 252-258, (1996)] 、Ming Peng らがエレクトロポレーション法によるヒラタケの形質転換 [Peng, M., et.al., Curr. Genet., 22, 53-59, (1992)] そして、Yanai, K. らがポリエチレンギリコール法によるヒラタケの形質転換 [Yanai, K. et. al., Biosci. Biotech. Biochem., 60, 472-475 (1996)] について報告し、Noë1 らがポリエチレンギリコール法によるフミヅキタケの形質転換 [Noë1, T and Labarere, J., Curr. Genet., 25: 432-437 (1994), Noë1, T. et al., Theor. Appl. Genet., 90: 1019-1027 (1995)] について報告している。

【0006】シイタケの宿主ベクター系は有効なものが確立されていなかった。その理由のひとつとして、シイタケにおいて効率的に異種遺伝子を発現させ得る発現用組換えベクターが存在しないことが挙げられる。シイタケ宿主用発現用組換えベクターとしては、シイタケras遺伝子のプロモーター及びPriA遺伝子のターミネーターを利用したpLCベクター [Yanai et. al., Biosci. Biotech. Biochem., 60, 472-475, 1996、特開平6-319547、矢内ら、日本農芸化学会1995年度大会講演要旨集、p230] が報告されている。しかし、このベクターを用いてシイタケの形質転換を行った場合において、その形質転換効率はきわめて低い（いずれもマイクログラムDNA当たり0.1個以下）ものであるため、汎用されるには至っていない。

【0007】一般に、より高い発現量をもたらす発現ベクターを構築するためには、mRNAへの転写効率が高いプロモーターを用いることが必要である。近年、我々は鋭意検討を重ね、有効なシイタケの形質転換方法及び発現ベクターを開発した（佐藤ら、特開平11-155568、平野ら、特願平10-247470）。

【0008】一方、ある特定の生育時期に特異的に発現させるプロモーターは、発現させる遺伝子によっては重要な因子になると考えられる。特に、子実体形成後に発現するプロモーターは、機能性タンパク質等の有用遺伝子産物を発現させる上で有効かつ重要であると考えられる。我々はすでにチロシナーゼ遺伝子（特開平10-174586）が、子実体形成後の後期に大量に発現していることを示唆する結果を得ている（Kanda. et. al., Biosci. Biotech. Biochem., 60, 479-480, 1996、佐藤ら、日本農芸化学会1999年度大会講演要旨集、p214）。したがって、シイタケチロシナーゼ遺伝子のプロモーター及びターミネーター領域は、特異的発現ベクターとして有用であると考えられる。しかし、現在までにシイタケ由来のチロシナーゼ遺伝子のプロモーター及び該プロモーターを含む組換えベクターは知られていない。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、シイタケのチロシナーゼ遺伝子の転写開始を指令するプロモーター、シイタケチロシナーゼ遺伝子の転写終結を指令するターミネーター、並びに該プロモーター及び/又は該ターミネーターを含む組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、該形質転換体を用いるポリペプチドの製造方法を提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するため、鋭意研究を行った結果、シイタケ菌糸から調製したcDNA及びゲノムDNAライブラリーからチロシナーゼ遺伝子を単離し、さらにそのプロモーター領域及びターミネーター領域を単離することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0011】すなわち、本発明は、以下の(a)又は(b)に示される、プロモーターとして機能し得るDNAを提供する。

(a) 配列番号1で表される塩基配列を含むDNA。
(b) 配列番号1で表される塩基配列において少なくとも1個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、かつプロモーター活性を有するDNA。さらに、本発明は、上記DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつプロモーター活性を有するDNAを提供する。

【0012】さらに、本発明は、以下の(c)又は(d)に示される、ターミネーターとして機能し得るDNAを提供する。

(c) 配列番号2で表される塩基配列を含むDNA。
(d) 配列番号2で表される塩基配列において少なくとも1個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含み、かつターミネーター活性を有するDNA。さらに、本発明は、上記DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつターミネーター活性を有するDNAを提供する。

【0013】さらに、本発明は、上記のプロモーターとして機能し得るDNA及び/又は上記のターミネーターとして機能し得るDNAを含有する発現用組換えベクターを提供する。さらに、本発明は、上記発現用組換えベクターに任意のポリペプチドをコードする遺伝子が組み込まれた組換えベクターを提供する。

【0014】さらに、本発明は、上記発現用組換えベクターを含む形質転換体を提供する。さらに、本発明は、上記組換えベクターを含む形質転換体、並びに、該形質転換体を培養又は栽培し、得られる培養物又は栽培物からポリペプチドを採取することを特徴とする前記ポリペプチドの製造方法を提供する。

【0015】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

1. シイタケチロシナーゼ遺伝子のプロモーター領域及びターミネーター領域の単離

本発明のプロモーターは、シイタケチロシナーゼ遺伝子の5'上流域から単離したものであり、ターミネーターは、シイタケチロシナーゼ遺伝子の3'下流域から単離したものである。

【0016】本発明のプロモーター及びターミネーターは、シイタケチロシナーゼ遺伝子（特開平10-174586）cDNAの配列決定、シイタケゲノムDNAライブラリーの調製、該ライブラリーからのシイタケチロシナーゼ遺伝子ゲノムDNAの単離、該ゲノムDNAの配列決定、cDNAとゲノムDNAの配列比較によるプロモーター領域及びターミネーター領域の特定、並びにこれらの領域の単離という手順で得ることができる。以下、各工程について説明する。

【0017】(1) mRNAの調製及びcDNAの作製

シイタケ (*Lentinula edodes*) からmRNAを抽出する。mRNAの抽出は、公知の方法、例えばオリゴ(dT)セルロースカラム法、マグネタイトオリゴ(dT)パーティクル法、あるいはNovagen社の Straight A's™ mRNA Isolation Kitを用いて行うことができる。mRNAの抽出に使用する組織としては、例えば子実体、菌糸等が挙げられる。

【0018】次に、これらの組織を凍結し、液体窒素存 在下で磨碎し、RNA抽出液を加えて全RNAの粗抽出物を得る。さらに、タンパク質、多糖類、その他の不純物を除去し、マグネタイトオリゴ(dT)パーティクルを用いて更に精製する。ポリA(ポリA+)鎖画分を溶出し、溶出液を集めめた後、同様の精製を2~3回繰り返すことによってmRNAを高度に濃縮する。一方、シイタケチロシナーゼの部分アミノ酸配列から合成した2種類の縮重オリゴヌクレオチドプライマーを設計する。

【0019】前記のように精製したmRNAをテンプレートにし、縮重オリゴヌクレオチドプライマーを用いてRT-PCRを行い、得られたシイタケチロシナーゼ遺伝子の部分塩基配列をクローニングした後、その塩基配列を解析する。塩基配列の解析は、例えばABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit, FS (Perkin Elmer)を用いて行うことができる。RT-PCR産物の塩基配列を基に、改めてシイタケチロシナーゼ遺伝子に特異的なプライマーを合成する。

【0020】上記プライマーを用いてRACE法によりシイタケチロシナーゼ遺伝子の5'末端側及び3'末端側の部分塩基配列を増幅する。RACE法は、例えば5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends及び3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (GibcoBRL)を用いて行うことができる。

【0021】RACE法によって増幅されたシイタケチロシナーゼ遺伝子の部分塩基配列をプラスミドベクターに組み込んだ後、トランسفォーメーションすることによってクローニングする。RACE産物のクローニングは、例えばOriginal TA Cloning Kit (Invitrogen)を用いて行うことができる。

【0022】(2) プローブDNAの作製

シイタケから単離精製されたチロシナーゼの部分アミノ酸配列から2種類の縮重オリゴヌクレオチドプライマー(Nプライマー及びCプライマー)を合成する。

【0023】Nプライマー：5'-T(C/T)CA(A/G)AT(A/C/T)GG(A/C/G/T)GG(A/C/G/T)AT(A/C/T)CA(C/T)GG-3' (配列番号6)

Cプライマー：5'-(A/G)(A/C/G/T)C(G/T)(A/G)TC(A/C/G/T)AC(C/T)TG(A/C/G/T)GC(A/G)TG(A/G)TG-3' (配列番号7)

【0024】この2種類のオリゴヌクレオチドプライマーを用いてRT-PCRを行い、得られるDNA断片を精製した後、クローニング及びシークエンシングを行

う。得られた塩基配列を基に改めて2種類のプライマー(N>GL.SQ01プライマー及びGL<C.SQ01プライマー)を合成する。

【0025】N>GL.SQ01プライマー：5'-GCGCAGGAAATAAGCCAGTAGACAC-3' (配列番号8)

GL<C.SQ01プライマー：5'-GCGTGGTGCATAAAGAAAAT-3' (配列番号9)

【0026】上記2種類のプライマーを用いて得られる650 bpのRT-PCR産物を精製した後、クローニングする。クローニングは、例えばOriginal TA Cloning kit (Invitrogen)を用いて行うことができる。得られたクローンからプラスミド調製した後、Eco RI消化によってインサート (RT-PCR産物) を回収し、プローブとして用いる。

【0027】(3) RACE産物からのスクリーニング
クローニングしたRACE産物から、チロシナーゼ遺伝子の部分塩基配列を有するクローンをスクリーニングする。スクリーニングは、例えば上記プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーション法、あるいは上記2種類のプライマーを用いたPCR法によって行われる。

【0028】(4) RACE産物のシークエンシング
RACE産物の塩基配列については、上記(3)で得られたクローンからプラスミドを調製し、市販のキット ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, FS (Perkin Elmer社製)を用いて決定することができる。

【0029】配列番号3にチロシナーゼ遺伝子cDNAを例示するが、本質的にチロシナーゼ活性を発現する配列であればこの配列に限定されるものではなく、欠失、置換、挿入、付加などによってその塩基配列を変異させることができる。

【0030】(5) シイタケのゲノムDNA及びゲノムDNAライブラリーの調製

ゲノムDNAの供給源は、上記(1)と同様に、シイタケの傘、菌褶、菌輪、菌柄、脚苞、菌糸など子実体の一部でもよく、子実体全体でもよい。また、胞子又は一次菌糸若しくは二次菌糸を0.25×MYPG培地、SMY培地、グルコース・ペプトン培地などの固体培地で培養後、菌糸を液体培地に接種し、生育した菌体を用いることができる。

【0031】ゲノムDNAの調製は、通常行われる手法により行うことができる。例えば、液体培養したシイタケの菌体を沪過などにより集菌後、菌体を液体窒素で凍結し、凍結菌体を乳鉢を用いて磨碎する。磨碎した菌体にDNA抽出用緩衝液を加え、クロロホルムを加え激しく搅拌する。クロロホルムを除去後、水層部分にエタノールを徐々に添加し、DNAが析出したところでゲノムDNAを巻取り、TE緩衝液に溶解することにより、ゲノムDNA溶液を得ることができる。あるいは、磨碎した菌体から、市販のキット(例えばISOPLANT(ニッポンジ

ーン社製)) を用いてゲノムDNAを得ることもできる。

【0032】ゲノムDNAライブラリーの作製は、ゲノムDNAを制限酵素Sau3AIなどの制限酵素で消化し、フェノール・クロロホルムで処理した後に、エタノール沈殿によりDNA断片を回収し、次いで市販のキット(例えば、Lambda EMBL3/Bam HI Vector Kit (Stratagene社製))を用い、該断片を、例えば入EMBL3-Bam HIアームにT4 DNAリガーゼを用いて連結し、得られたファージDNAを大腸菌に感染させることにより作製することができる。

【0033】(6) ゲノムチロシナーゼ遺伝子の単離
ゲノムチロシナーゼ遺伝子は、ゲノムDNAライブラリーから通常の方法(例えばPCR法、プラーカハイブリダイゼーション法等)によりスクリーニングすることができる。すなわち、上記チロシナーゼcDNA断片をプローブとして、シイタケゲノムDNAライブラリーからスクリーニングする方法等が挙げられる。

【0034】この断片をペルオキシダーゼ、アルカリフィオスファターゼなどによる酵素直接標識又は³²P、³⁵Sなどによる放射性標識後、プローブとして用い、これらをファージライブラリーのDNAを変性固定したニトロセルロースフィルターやナイロンメンブレンフィルターとハイブリダイズさせる。そして得られたポジティブナルからファージクローンを同定し、シイタケのチロシナーゼ遺伝子をクローニングすることができる。

【0035】上記のようにして得られる陽性クローンの塩基配列は、ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, FS (Perkin Elmer社製) 等の市販のキットを用いて決定することができる。PCR反応は該キットに添付のマニュアルにしたがって行い、得られたPCR産物はABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer社製) 等によって解析することができる。このようにして決定される全塩基配列としては、例えば配列番号5で表されるものを挙げることができる。この配列はチロシナーゼ遺伝子を含むゲノムDNAの塩基配列である。この配列と、配列番号3のチロシナーゼ遺伝子を含むcDNAの塩基配列の配列の比較から、解析したチロシナーゼ遺伝子は図1のように8つのインtron(直線部分)を有する9つのエキソンに分断されて、ゲノム上に存在することがわかる。

【0036】(7) チロシナーゼ遺伝子のプロモーター領域及びターミネーター領域の単離

チロシナーゼ遺伝子のプロモーター領域及びターミネーター領域の単離は、該領域をそれぞれ含むチロシナーゼ遺伝子の上流約2.6kbpの領域及び下流約1kbpの領域を、上記(6)において決定された塩基配列に基づいて合成したプライマーを用いて、ゲノムライブラリーからクローニングしたゲノムチロシナーゼ遺伝子、シイタケ染色体DNAなどを鋳型としてPCRによって増幅する

ことにより行うことができる。ここで、プロモーター領域単離のためのPCRに用いることができるプライマーとして、例えば、5'-ATTCCAAGCCTGTATTCCCTCTATCG-3' (配列番号10) の塩基配列で表される5'センスプライマー(TproUプライマーともいう)及び5'-CTCTGTGAAAACAAATCGGTGTGGGG-3' (配列番号11) の塩基配列で表される3'アンチセンスプライマー(TproLプライマーともいう)が挙げられる。また、ターミネーター領域単離のためのPCRに用いることができるプライマーとして、例えば、5'-GGAATTCGAATGAACTATCGCGATAAATAAATAATGT-3' (配列番号12) の塩基配列で表される5'センスプライマー(TterUプライマーともいう)及び5'-AGCTTC TGCCCTTTCTGCCGTCTTA-3' (配列番号13) の塩基配列で表される3'アンチセンスプライマー(TterLプライマーともいう)が挙げられる。

【0037】配列番号1に本発明のプロモーター活性を有するDNA断片の塩基配列、配列番号2に本発明のターミネーター活性を有するDNA断片の塩基配列を例示するが、前者の場合であればプロモーター活性、後者の場合であればターミネーター活性を有する限り、当該塩基配列において少なくとも1個の塩基の欠失、置換、付加等の変異が生じてもよい。ここで、欠失、置換、付加とは、1~10個の短い欠失、置換、付加のみならず、10~50塩基、さらには50~100塩基の長い欠失、置換、付加も含む。

【0038】また、上記プロモーター遺伝子又はターミネーター遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつプロモーター活性を有するDNAも本発明のプロモーター遺伝子又はターミネーター遺伝子に含まれる。ストリンジェントな条件とは、例えばナトリウム濃度が、10mM~300mM、好ましくは20~100mMであり、温度が25°C~70°C、好ましくは42°C~55°Cでの条件をいう。

【0039】なお、DNAに変異を導入するには、Kunkel法やGapped duplex法等の公知の手法又はこれに準ずる方法を採用することができる。例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット(例えばMutant-KやMutant-G (TaKaRa社製))などを用いて、あるいはTaKaRa社のLA PCR in vitro Mutagenesisシリーズキットを用いて変異を導入することができる。

【0040】一旦、本発明のDNA断片の塩基配列が確定されると、その後は化学合成によって、又は本発明のDNA断片を含むcDNA若しくはゲノムDNAを鋳型としたPCRによって、あるいは該塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせることにより、本発明のDNA断片を得ることができる。

【0041】2. 本発明の発現用組換えベクターの構築
本発明の発現用組換えベクターは、従来のシイタケ用発現ベクターと異なり、上記1. で得られるチロシナーゼ遺伝子プロモーター及び/又はチロシナーゼ遺伝子ター

ミネーターを組み込んだ発現ベクターである。本発明の発現用組換えベクターは、上記プロモーター及び／又はターミネーターを適当なプラスミドベクター（例えば、pUC19ベクターなど）に連結することにより構築することができる。

【0042】発現用組換えベクターには、外来遺伝子の導入を実際に確認する上で有効なマークー遺伝子を併用して使用することが望ましい。そのため本発明の発現用組換えベクターには、チロシナーゼ遺伝子のプロモーター領域の下流に、例えば抗生物質ハイグロマイシンBに対する抵抗性を付与するハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ(hph)遺伝子 [Griz and Davis, Gene, 25: 179-188 (1983)]、除草剤ビアラフォスに対する抵抗性を付与するホスフィノトリシアセチルトランスフェラーゼ(bar)遺伝子 [Murakami et al., Mol. Gen. Genet., 205: 42-50 (1986)]などを連結するとよい。こうして作出した発現用組換えベクターをPEG法、エレクトロポレーション法、REMI法などの様々な遺伝子導入法でシイタケに導入し、その薬剤に対する抵抗性を指標として形質転換体を得ることができる。

【0043】3. 本発明の発現用組換えベクターを用いるポリペプチドの生産

本発明の発現用組換えベクターを用いて、シイタケにおいて目的のポリペプチドを遺伝子工学的に得ることができる。

【0044】上記2. の発現用組換えベクターに、目的のポリペプチド、例えば、インシュリン、成長ホルモン、チロシナーゼ、ラッカーゼ、ペルオキシダーゼなどの有用タンパク質等をコードする遺伝子を連結（挿入）することにより組換えベクターを作製することができる。本発明のベクターに目的のポリペプチドをコードする遺伝子を挿入する方法としては、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、本発明のベクターの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法などが挙げられる。得られた組換えベクターをシイタケにPEG法、エレクトロポレーション法、REMI (Restriction Enzyme-Mediated Integration) 法などの方法により導入することにより、形質転換体を得ることができる。

【0045】次いで、得られた形質転換体を培養し、その培養物から採取することにより、目的のポリペプチドを得ることができる。

【0046】本発明において形質転換体の菌糸を培養する方法としては、シイタケの培養に用いられる通常の方法に従って行われる。シイタケを宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、シイタケが資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類などを含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

【0047】炭素源としては、グルコース、フルクトー

ス、スクロース、デンプン、マルトース、デキストリン等の炭水化物が用いられる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機塩類若しくは有機酸のアンモニウム塩又はその他の含窒素化合物のほか、ペプトン、肉エキス、コーンスティーピリカー、カザミノ酸、NZアミン等が用いられる。

【0048】無機物としては、リン酸第1カリウム、リン酸第2カリウム、塩化カルシウム、硫酸マグネシウム、炭酸ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸亜鉛、塩化マンガン、炭酸カルシウム等が用いられる。

【0049】菌糸の培養は、液体培地での振盪培養、通気搅拌培養、固体培地での静置培養等の好気～微好気条件下、25°Cで数日間～2ヶ月程度行うことが好ましい。継代は生育した菌糸の一部を新たな培地に接種することにより行うことができる。培養中は、必要に応じてハイグロマイシンやビアラフォス等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0050】目的のポリペプチドがシイタケ子実体において生産される場合には、シイタケ菌株を用いて子実体を立ち上げることができる。シイタケ子実体を立ち上げる方法としては、例えば、菌床培養が挙げられる。

【0051】菌床培養を行うためには、まず、種菌を調製する。ここで、「種菌」とは、シイタケ栽培において種として使用するもので、適度な条件下で純粋に培養した菌体又は培養物をいう。このような種菌としては、液体培地にて調製した液体種菌、菌糸を断片化した液体種菌、寒天培地で調製したもの、オガクズ種菌等が挙げられる。

【0052】種菌の調製は、公知の方法を用いて行うことができ、その方法は特に制限されないが、ここでは1例としてオガクズ種菌培養法を用いた例を示す。培地は、オガクズと米ヌカとを10:1の割合で混合し、含水率63%に調製する。これをポリプロピレン製培養器(800ml)に500g充填し、蓋をして121°Cで40分間加圧蒸気滅菌をする。室温まで放冷した後、シイタケ菌株を接種し培養する。培養の条件は、当業者であれば適切に設定することができるため、特に制限されない。このような培養は、例えば、20°C、相対湿度65%にて約50日間培養することにより行うことができる。

【0053】次に、上記のようにして得られる種菌を用いて、菌床培養を行う。ここで、「菌床」とは、シイタケの栽培を目的として調製された培地に種菌を接種したもの、又はその菌が蔓延したものをいう。この菌床培養は、当業者であれば適切に行うことができるため、その方法は特に制限されないが、1例として以下の方法を挙げることができる。

【0054】オガクズ：北研バイデル(10:1)からなる培地の水分を63%に調整し、フィルター付きポリプロピレン製袋に、培地を2.5kg詰め込み、直方体(密

度0.7g/cm³)に成形する。培地中央部に直径2cmの穴を底部に到達するまで開け、これをオートクレーブにて、121℃で40分間滅菌し、室温で一晩放冷したものを培養基とする。この培養基に上記オガクズ種菌を約17gずつ接種し、ヒートシーラーにて速やかに袋を閉じる。これを20℃、相対湿度65%の条件下において暗黒下で培養する。この培養は、菌糸が菌床全面に蔓延し、完熟するまで行うが、通常、種菌接種から菌床完熟までの期間は102~116日間である。

【0055】最後に、上記の菌床培養によって得られる菌床から子実体を発生させる。この操作は当業者であれば適切に行うことができるため、その方法は特に制限されないが、1例として以下のような方法を挙げることができる。

【0056】菌床完熟培養した袋を開封して菌床を取り出し、温度16℃、湿度85%、照度300ルックス(12時間おき)の条件下で子実体を発生させ、収穫する。子実体の芽出しから収穫までの期間を特に「発生期間」というが、この発生期間は、当業者であれば適切に設定することができるため、特に制限されない。発生終了後、浸水処理(約20時間)を施した後に、再度発生のための培養を行って2回目の発生を行う。さらに、収穫後、再度浸水処理を行い、2回目と同じく子実体の発生を行うことができる。

【0057】培養後、目的のポリペプチドが菌体内あるいは子実体内に生産される場合には菌体あるいは子実体を破碎する。一方、目的のポリペプチドが菌体外に分泌される場合には、液体培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体を除去し、上清を得る。そして、ポリペプチドの単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー等を単独で又は適宜組み合わせて用いることにより、上記培養物中から目的のポリペプチドを単離精製することができる。

【0058】

【実施例】以下に実施例を挙げて、本発明をより具体的に説明する。ただし、これらの実施例は説明のためのものであり、本発明の技術的範囲を制限するものではない。

【0059】〔実施例1〕シイタケチロシナーゼ遺伝子のプロモーター領域及びターミネーター領域の単離
(1) シイタケ菌糸の調製

北研産業(株)のシイタケ菌株北研57の2核菌糸を0.25×MYPG寒天培地(0.25%麦芽エキス、0.1%酵母エキス、0.1%ペプトン、0.5%グルコース、1.5%寒天)に接種し、約2週間、25℃で培養した。生育した菌糸を寒天培地上からかきとり、100mlの0.25×MYPG液体培地の入った200ml容三角フラスコに接種した。接種後、25℃で約2~4週間振盪培養し、菌糸を生育させた。

【0060】(2) シイタケ子実体採取

子実体形成は松本ら(T. Matsumoto et al., Rept. Tottori Mycol. Inst., 26, 46-54 (1988))の方法に準じて行い、菌傘底部の被膜が切れ始めた状態の子実体を収穫し、25℃で3日間保存した褐変開始前の菌褶部から総RNAの抽出を行った。

【0061】(3) 総RNAの抽出

試料から総RNAの抽出はISOGEN(Nippon Gene社)のプロトコールに準じて行った。その結果、試料1gから精製された総RNA 0.5mgを得た。

(4) mRNAの調製

RNA 0.5mgに対して、Straight A's™ mRNA Isolation Kit (Novagen社)を利用し、Anneal Magnetight™ Oligo (dT) Particleを用いたアフィニティー精製法を行うことによりmRNAを精製した。最終的に27μgのmRNAが精製された。

【0062】(5) cDNAの調製

mRNAからのcDNAの調製には、逆転写酵素として、SuperScript II™ RNaseH- Reverse Transcriptase(GibcoBRL)を用いた。反応は常法にしたがって42℃で60分反応し、95℃で10分加熱処理して反応を停止した。反応液からcDNAを常法にて精製単離した。

【0063】(6) シイタケチロシナーゼ遺伝子部分塩基配列の調製

シイタケチロシナーゼの部分アミノ酸配列(K. Kanda et al., Biosci. Biotech. Biochem., 60, 1273-1278 (1996))から2種類の縮重オリゴヌクレオチドプライマー(Nプライマー及びCプライマー)を合成した。

【0064】Nプライマー: 5'-T(C/T)CA(A/G)AT(A/C/T)GG(A/C/G/T)GG(A/C/G/T)AT(A/C/T)CA(C/T)GG-3' (配列番号6)

Cプライマー: 5'-(A/G)(A/C/G/T)C(G/T)(A/G)TC(A/C/G/T)AC(C/T)TG(A/C/G/T)GC(A/G)TG(A/G)TG-3' (配列番号7)

【0065】これら縮重オリゴヌクレオチドプライマーを用いて、上記cDNAをテンプレートにしてPCRを行った。反応は、94℃で1分、50℃で1分、72℃で2分の反応を1サイクルとしてこれを30サイクル行った。得られた700 bpのRT-PCR産物は常法にしたがって精製した後、クローニングを行った。

【0066】(7) RT-PCR産物のシークエンシング

RT-PCR産物の塩基配列については、上記(6)で得られたクローンからRPM Kit(Bio101)でプラスミドを調製し、このプラスミドをテンプレートとしてABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, FS (Perkin Elmer)を用いたPrimer Walking法によってシークエンシングを行い、塩基配列を決定した。この塩基配列から改めてシイタケチロシナーゼ遺伝子に特異的な2種類のプライマー(N>GL.SQ01プライマ

一及びGL<C.SQ01プライマー)を合成した。

【0067】N>GL.SQ01プライマー：5'-GCGCAGGAAATAAG
CCAGTAGACAC-3' (配列番号8)

GL<C.SQ01プライマー：5'-GCGTGGTGATAAAGAAAAT-3'
(配列番号9)

【0068】(8) RACE法によるシイタケチロシナーゼ遺伝子の5'末端側の塩基配列の調製GL<C.SQ01プライマーを用いて、5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (GibcoBRL)を利用してシイタケチロシナーゼ遺伝子の5'末端側の塩基配列をキットのプロトコールにしたがって増幅した。得られた5' RACE産物は常法にしたがって精製した後、クローニングを行った。

【0069】(9) RACE法によるシイタケチロシナーゼ遺伝子の3'末端側の塩基配列の調製N>GL.SQ01 プライマーを用いて、3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (GibcoBRL)を利用してシイタケチロシナーゼ遺伝子の3'末端側の塩基配列をキットのプロトコールにしたがって増幅した。得られた3' RACE産物は常法にしたがって精製した後、クローニングを行った。

【0070】(10) プローブDNAの調製

前記(4)で調製したcDNAをテンプレートにし、前記(7)で合成した2種類のプライマー(N>GL.SQ01プライマー及びGL<C.SQ01プライマー)を用いてPCRを行った。反応は、94°Cで30秒、60°Cで30秒、72°Cで1分の反応を1サイクルとしてこれを30サイクル行った。得られた650 bpのPCR産物を常法にしたがって精製した後、クローニングを行った。得られたクローンからプラスミドを調製した後、Eco RI消化によってインサートを回収し、プローブDNAとした。

【0071】(11) シイタケチロシナーゼ遺伝子の部分塩基配列を有するRACE産物のスクリーニング

前記(8)及び(9)で作製したRACE産物を有するクローンから、前記(10)で調製したプローブを用い、コロニーハイブリダイゼーション法でシイタケチロシナーゼ遺伝子の部分塩基配列を有するクローンをスクリーニングした。

【0072】(12) シイタケチロシナーゼ遺伝子部分塩基配列を有するRACE産物のシークエンシング

RACE産物の塩基配列については、前記(7)の方法にしたがって解析した。5'RACE産物及び3'RACE産物は、ともに前記(10)で得られたシイタケチロシナーゼ遺伝子に特異的な650 bpの塩基配列を有するので、この配列を基準にしてシイタケチロシナーゼ遺伝子の全塩基配列を決定した。決定した塩基配列を配列番号3に示す。

【0073】シイタケチロシナーゼをコードするcDNAの塩基配列は、配列番号3で表される塩基配列を含み、また、第21-23番目の塩基配列によってコードされるメチオニンから第1875-1877番目のTAATで終了する単一のオープンリーディングフレーム(アミノ酸618残基)が存在していた。このオープンリーディングフレームに

よりコードされるアミノ酸配列を配列番号4に記載した。なお、このオープンリーディングフレームの上流には、20塩基の非翻訳領域(第1~20番目の塩基配列)が存在していた。

【0074】さらに、オープンリーディングフレームの下流にはポリ(A)領域が存在しているので、このcDNAは完全長のものであると言える。これらの塩基配列から、シイタケから得られたチロシナーゼのアミノ酸残基数は618個で、その分子量は68kDaと推定される。

【0075】ここに得られたシイタケチロシナーゼのアミノ酸配列領域を、麹菌(*Aspergillus oryzae*)、アカパンカビ(*Neurospora crassa*)及びマッシュルーム(*Agaricus bisporus*)のチロシナーゼのアミノ酸配列領域と比較すると、それぞれ36.3%、30.8%及び54.0%の相同性が認められるが、かなりの部分で異なっていることから、配列番号3及び4で表される塩基配列及びアミノ酸配列は、シイタケ特有のものであることが示された。

【0076】(13) シイタケのゲノムライブラリーの調製

液体培養により生育させた菌糸をガラスフィルターで回収し、ペーパータオルで菌糸の水分を可能な限り搾り取った。回収した菌糸約1gを乳鉢に入れ、液体窒素を適量加えて磨碎した。磨碎した菌糸を50mlポリプロピレンチューブに移し、20mlのTESS緩衝液(pH 8.0)、1mM EDTA(pH 8.0)、1%SDS)を加えて、65°Cで1時間インキュベートした。これに終濃度が1Mとなるように5M NaClを加えて、8,000×gで20分間遠心し、上清を回収した。回収した上清に等量のフェノール・クレゾール試薬(100gのフェノールに、4.7mlのm-クレゾールを加えて50°Cで溶解させ、そこに8-キノリノールを0.05%となるよう加えて、さらに等量の1M NaClで平衡化させたものを加え、1,300×gで5分間遠心して、上清(水層)を回収した。さらに、クロロホルム処理、エタノール沈殿を行って、1mlのTE緩衝液に溶解した。その溶液をRNase A及びproteinase Kで処理し、フェノール・クロロホルム処理とエタノール沈殿を行って、適量のTE緩衝液に溶解し、染色体DNA試料とした。

【0077】得られたDNA試料を制限酵素Sau 3AIによって消化し、フェノール・クロロホルム処理後、エタノール沈殿を行って適量のTE緩衝液に溶解した。得られたDNA断片を用い、Lambda EMBL3/Bam HI Vector Kit(Stratagene社製)によりゲノムDNAライブラリーを作製した。

【0078】(14) ゲノムライブラリーからのチロシナーゼ遺伝子の単離

上記(13)において作製したゲノムライブラリーから、上記(7)とほぼ同様の手順でチロシナーゼ遺伝子を単離した。プラーカの形成及びライブラリーの増幅は、大腸菌XL1-blue MRA株を使用して、Lambda EMBL3 /

Bam HI vector kit (Stratagene社製) のマニュアルに基づいて行い、ブラークハイブリダイゼーション及びシグナルの検出は、cDNAライブラリーからのチロシナーゼの単離と同じ手順で行った。そして、得られたシグナル付近のブラークを搔き取り、それをSM緩衝液 (100mM NaCl, 100mM MgSO₄, 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.01% ゼラチンを含む) に懸濁した。このファージ懸濁液を適度に希釈して、プレーティングし、上記と同様のスクリーニングを行い、ゲノムのチロシナーゼ遺伝子を含む組換え体ファージを得た。クローン化したファージをそれぞれプレーティングし、37°Cで6~8時間インキュベートしてブラークを形成させた。ブラークが形成したプレートに10mlのSM緩衝液を重層し、4°Cで12時間以上振盪培養して、ファージをSM緩衝液中に遊離させた。ファージを含むSM緩衝液を15mlのプロピレンチューブに回収し、クロロホルムを終濃度5%となるように加えて、室温に15分間放置し、それを1,500×gで10分間遠心し、上清を回収した。次いで、Wizard Lambda Preps DNA Purification System (Promega社製) を用いて、回収した上清からファージDNAを精製し、塩基配列の決定に供した。

【0079】(15) 塩基配列の決定

上記(14)において得られた陽性クローナーの塩基配列を、ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, FS (Perkin Elmer社製) を用いて決定した。PCR反応はそのマニュアルに基づいて行い、得られたPCR産物はABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer社製) によって解析した。決定したチ

ゲノムDNA溶液	1.0 μl (10 ng)
10×PCR緩衝液	5.0 μl
25mM MgCl ₂	5.0 μl
2mM dNTPミックス	4.0 μl
20 μM プライマー (センス)	0.5 μl
20 μM プライマー (アンチセンス)	0.5 μl
5 U/μl Taq ポリメラーゼ	0.25 μl
滅菌水	33.75 μl
全量	50 μl

【0083】PCRは96°Cで30秒間の熱変性、60°Cで30秒間のアニーリング、72°Cで2分間の伸長反応の条件を1サイクルとして、30サイクル行った。反応終了後、反応液を新しいマイクロチューブに移し、そのうち5 μlを1%アガロースゲルによる電気泳動に供し、增幅断片の確認を行った。次いで、残りの反応液にフェノール・クロロホルム処理とエタノール沈殿を行い、ペレット化したPCR産物を20 μlのTE緩衝液に溶解した。

【0084】得られたPCR産物を1%低融点アガロースゲル電気泳動に供し、約2,650bpの断片を切り出した。その断片をQIAEX II (QIAGEN社製) を用いてゲルから抽出し、配列番号1で表される塩基配列を有するチロシナーゼ遺伝子プロモーターを精製した。

【0085】(2) チロシナーゼ遺伝子のターミネータ

シナーゼ遺伝子を含むゲノムDNAの塩基配列を配列番号5に示す。チロシナーゼ遺伝子を含むcDNAの塩基配列である配列番号3との比較から、解析したチロシナーゼ遺伝子は図1のように8つのイントロン（直線部分）を有する9つのエキソンに分断されて、ゲノム上に存在することを見出した。

【0080】【実施例2】pLT-hphベクターの構築

(1) チロシナーゼ遺伝子のプロモーター領域の単離 単離したチロシナーゼ遺伝子の塩基配列（配列番号5）のうち、翻訳開始コドン（配列番号5中の第2656~2658塩基）を含む5'側上流域約2.6 kbの領域には、各種プロモーターに見出される特定塩基配列（TATA box, CAAT box等）が存在していた。そこで、この領域をプロモーター領域とみなし、ゲノムチロシナーゼ遺伝子を錠型としてPCRを行い、チロシナーゼ遺伝子のプロモーター領域を大量に調製した。

【0081】5'センスプライマー (TproUプライマーともいう) として、翻訳開始点から-2647~-2621bpの位置に存在する配列5'-ATTCCAAGCCTGTATTCCCTCCTATCG-3'（配列番号10）を有するものを用い、3'アンチセンスプライマー (TproLプライマーともいう) として、翻訳開始点から-38~-10bpの位置に存在する配列5'-CTCTG TGAAACAAATCGGTGTGGGG-3'（配列番号11）を有するものを用いた。PCRの反応液組成は以下の通りである。

【0082】

【表1】

一領域の単離

単離したチロシナーゼ遺伝子（配列番号5）の翻訳終止コドン（配列番号5中の第4972~4974塩基）を含む3'側下流域約1kbの領域をチロシナーゼ遺伝子ターミネーター領域とみなし、ゲノムチロシナーゼ遺伝子を錠型として、PCRを行った。

【0086】5'センスプライマー (TterUプライマーともいう) として、終止コドンから14~51bpの位置に存在する配列5'-GGAATTCGAATGAACTATCGCGATAAATAATGT-3'（配列番号12）を有するものを用い、3'アンチセンスプライマー (TterLプライマーともいう) として、終止コドンから961~988bpの位置に存在する配列5'-AGCT TCTGCCCTCTTGCGTCCTTA-3'（配列番号13）を用いた。PCR反応はプロモーターの単離と同条件で行つ

た。

【0087】得られたPCR産物を1%低融点アガロースゲル電気泳動に供し、約1,000bpの断片を切り出した。その断片をQIAEX II (QIAGEN社製) を用いてゲルから抽出し、PCR産物を精製し、配列番号2で表される塩基配列を有するチロシナーゼ遺伝子ターミネーターを調製した。

【0088】(3) 組換えベクターの構築

上記(1)及び(2)において単離したチロシナーゼのプロモーター領域とターミネーター領域を利用し、異種生物由来の遺伝子としては、大腸菌由来のハイグロマイシンB耐性遺伝子(hygromycin B phosphotransferase, hph) [Gritzand Davies, Gene, 25, 179-188, 1983] を用い、シイタケを宿主とする組換えベクターを構築した。

【0089】すなわち、hph遺伝子をマーカー遺伝子として有するpCHベクター[Matsuki et al., Mol. Gen. Genet., 220, 12-16, 1989]を制限酵素BamH Iで消化することによりhph遺伝子断片を切り出した。その断片を、BamH Iで消化した大腸菌のプラスミドベクターpUC19 [Yanisch-Perron et al., Gene, 33, 109-119, 1985]に組込み、コンピテント細胞Top 10 F' (Invitrogen社製) に導入して、hph遺伝子を含有するpUC19プラスミドを大量に調製した。そのプラスミドベクターを制限酵素Xba Iで消化し、平滑末端化、脱リン酸化を行った後、pT7Bl ue PerfectlyBlunt Cloning Kit (Novagen社製) を用いて、単離したチロシナーゼ遺伝子のプロモーターとライゲーションさせた。こうして作出したプラスミドの内、転写方向的に正しく挿入されたものを選抜して、大量に調製した。このプラスミドベクターを制限酵素Sma Iで消化し、脱リン酸化を行った後、上述の方法で単離したチロシナーゼ遺伝子のターミネーターとライゲーションさせた。こうして作出したプラスミドの内、転写方向的に正しく挿入されたものを選抜して、大量に調製した。得られたpLT-hphベクターの模式図を図2に示す。

【0090】〔実施例3〕REMI法によるシイタケの形質転換

(1) プロトプラストの調製

野性型のシイタケ菌株S-1の二核菌糸を、0.25×MYPG寒天培地(0.25%麦芽エキス、0.1%酵母エキス、0.1%ペプトン、0.5%グルコース、1.5%寒天)上、25°Cで2週間培養した。生育した菌糸をかきとり、50mlの0.25×MYPG液体培地で1週間培養した。得られた菌糸はガラスフィルターで集菌し、50mlの0.25×MYPG液体培地に懸濁してポリトロンホモジナイザーで裁断し、100μmのナイロンメッシュで沪過した沪過菌糸をさらに0.25×MYPG液体培地中、25°Cで5日間培養した。培養菌糸は100μmのナイロンメッシュで集菌後、クエン酸緩衝液(0.6Mマンニトールを含む50mMクエン酸緩衝液、pH5.6)で2回洗浄し、菌糸1g当たり10mlの酵素溶液(2.5%セルラー

ゼ、0.1%キチナーゼを含むクエン酸緩衝液)に菌糸を懸濁し、28°Cで3~4時間インキュベートした。酵素処理した菌糸を40μmのナイロンメッシュで沪過し、沪液を1,500×gで10分間遠心分離して、プロトプラストを沈殿させた。上清を捨て、プロトプラストをSTC緩衝液(10mM塩化カルシウム、1.2Mソルビトールを含む10mM Tris-HCl、pH7.5)で洗浄後、再び1mlのSTC緩衝液にプロトプラストを懸濁し、顕微鏡でプロトプラストの数を計測した。最終的には、STC緩衝液100μlに0.5~1.0×10⁷個のプロトプラストとなるように調整して、形質転換用のプロトプラストとした。

【0091】(2) pLT-hphベクターの導入

形質転換は、pLT-hphベクターを3箇所で切断する制限酵素Dra I、又は1箇所で切断する制限酵素Hind III、Sal I若しくはSph I(図1参照)を用いたRestriction Enzyme Mediated Integration (REMI) 法によって行った(特開平11-155568)。すなわち、2.5μgのpLT-hphと50ユニットのDra I、Hind III、Sal I又はSph Iを含む150μlのSTC緩衝液に、上記のプロトプラスト懸濁液100μlを穏やかに加え、氷内で20分間インキュベートした。これに62.5μlのPEG溶液(10mM塩化カルシウム、60%PEG4000を含む10mM Tris-HCl、pH7.5)を加え、氷内で20分間インキュベートした。さらに3.125mlのPEG溶液を加えて、室温で20分間インキュベートした。次に、10mlのSTC緩衝液を加えて溶液全体を十分に懸濁し、1,500×gで10分間遠心し、プロトプラストを沈殿させた。回収したプロトプラストを4mlのMS液体培地(2%麦芽エキス、0.6Mスクロース)に懸濁し、25°Cで3~4日間静置培養した。

【0092】(3) ハイグロマイシンB耐性菌糸の選抜
プロトプラストから再生した菌糸を1,500×gで10分間遠心することで回収した。回収した菌糸を1mlのMS液体培地に再懸濁し、5μg/mlハイグロマイシンBを含む最少寒天培地(2%グルコース、0.2%酒石酸アンモニウム、0.05%硫酸マグネシウム、0.1%リン酸二水素カリウム、0.112%炭酸ナトリウム、0.132%フマル酸、10ppm硫化鉄、8.8ppm硫化亜鉛、7.2ppm塩化マンガン、pH4.5、1.5%寒天)にまき、25°Cで5日間培養した。次に、一旦溶解し、50°C程度に冷却させた0.25×MYPG寒天培地に、20μg/mlハイグロマイシンBを加え、それを最少寒天培地上で生育した菌糸上に重層した。25°Cで約5日間培養後、増殖してきた菌糸を分離し、新しい20μg/mlハイグロマイシンBを含む新鮮なMYPG寒天培地に植え替えた。さらに1週間程度培養し、増殖してきた菌糸を新しい20μg/mlハイグロマイシンBを含む新鮮なMYPG寒天培地に植え替えて培養し、ハイグロマイシン耐性を獲得した菌糸を選抜した。

【0093】(4) 結果

その結果を表2に示す。数値は3連の実験の平均値である。pLT-hphベクターの導入によりハイグロマイシン耐

性を獲得したシイタケ形質転換体が作出され、本発明の
発現用組換えベクターが、シイタケを宿主とする異種遺
伝子発現用ベクターとして有効であることを確認した。

【0094】

【表2】

形質転換体出現率

プラスミドベクター	制限酵素	形質転換体数／2.5 μg ベクターDNA
pLT-hph	50u Dra I	18.0
pLG-hph	50u Dra I	22.0

【0095】

【発明の効果】本発明により、シイタケチロシナーゼ遺伝子の転写開始を指令するプロモーター、シイタケチロシナーゼ遺伝子の転写終結を指令するターミネーター、該プロモーター及び/又は該ターミネーターを含む組換

えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、並びに該形質転換体を用いるポリペプチドの製造方法が提供される。

【0096】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Iwate prefecture

<120> Promoter Gene

<130> P99-0629

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2639

<212> DNA

<213> Lentinula edodes

<400> 1

attccaagcc tgtattccct cctatcgccgg gaatcggtta cctatccacc cctttctt 60

tcgatacgac gccggaagat aggcaaacag cttaagagc gatatcatgaa acagaagacg 120

ctaaggagat atatgagcac tcacccgtcg gattgataga ggcttatcc gcatcatctc 180

tagtttgga tccgagaaaa ttcccttgct tgattgttctt agcacagtac gacccgtacg 240

tcattaagtt cggttgttcaagatgata acagtcgaga aatcgcttc caggcaagaa 300

atccaagatt caacccttctc gttttagag gaatatcgca gaaaaagtcc gcaagaaatc 360

ttaccagagt tcgtggcgt ggctggacac aaccatattt cacatgttg ttcaatttgg 420

acagaggacg acgtgtgggg gagattactg cgccgatgg ttggaaagt ctgttcaagg 480

tgagccacgc attcgtaag atgtactgta actgaatgaa cgagtcgct catagattt 540

cttggaaactt caaaggcaaa gatttggacg ctttagacgaa gcagtggac ttactgtaat 600

cttgatatgg atgttatga atggataccc gttcaagttg aagagaaaacg gttgcctaac 660
 ttcagaattt aacgcagtcg gaccaagggg cattcgctc cgaaatgcca gactcgacgc 720
 accaccgagt tcccttgcg caagccttg cgcaaagtgt taaatgttgt cctgaaattc 780
 caaagagatt ttattcacga acgagaatat tatgtacatt cgtccg tgaactaacc 840
 aggtgcactg ttacatgtca cgttaggac ggttatctac tatctgccat tcggatgacc 900
 gaggtgcca ctggatatac gtgactaagg gattcagccg tcatcgatgg gacatgaata 960
 tgcatgaata ttgaatcagc aaaatgaatc aacacccctt ggtttctcg ctttcagag 1020
 gcatcctgag gcaacctcta cgaaattttt catgttcgt tttccgtt caccgt ctccgcagct 1080
 gtactacctc tgacataaaa cttttccccg ttccaatga gacctccaca cctctcgagc 1140
 ttggataagg cttcagcggtt atggattcga ttccagcttc cgccccgtt gtcttcgtt 1200
 ttccataatga atttctgga catgtcatgg ttgacaagag caatctctt gaaaaactat 1260
 acctataatt ttgaccggcg gtgtatcag gtataatcag gttgttagtaa tgttcgaaa 1320
 gttcaaccc aggtttccc tcccttctc tcccatgtt ctgtcactgt cactcgact 1380
 tctctggaag taacagatata tggaaactgtt tagcagaaaa caagtcaac ggacatcaca 1440
 tacctctctt ttgtcgca ccaaattttc cccttctgtt gtatcccggt tgtctaaat 1500
 gtcggcatct tggatcgat tttcgccgac acatagcgct agtgcataat cccaaatcctt 1560
 tcttagagct ctatcttca actctcatca aataaacgt tcaaataac caaaggctgg 1620
 gtatatacgtt ctttcgtt cggcatttca ttctgcattt atccacatcc tgactggat 1680
 acacggctga cgagataagg agccggatgg cacttaagaa gtccagatta tatcgactgc 1740
 gatgtataaa gaatagaggt gagcagtgtt gagctatgtt tgttccgga tcatcgttc 1800
 ttctcatttca cacaatggtc ctacaaacga gcaaagtgtt cttaccactg gattgttcaa 1860
 cgaatatttt tccaaaaca aattttttt ccaatttata tgaccttggat tgacacaagt 1920
 ggttggatggc ttttgtcaag atgcttcac ggcgttggat ccatgttcgt gtataagtat 1980
 gaaccatag acgcccgtcg aattttcagt gcccgtgtca atggagtaat cctcgctt 2040
 cgggctacat agtttaggtt gttgggttta atagcgacat acaattcaag gaggcctaac 2100

aaaacactac ttccggaaacc aaggattatt accattgtc aggtgaaagt tagatccgt 2160
 caaactcage ccgaatcttg actaaaacac atactgaaga cagccgaaga agcaatggaa 2220
 tgaatctagt cccgttggtg ttgaccctct tttcttatca ctcaatcgga cggcagattc 2280
 cagaggccga ccaatactgc taagactgca gacagaggtc gcttaaccga catgattcta 2340
 tcaaacaat ctcagccact ttctccgtt ctgtcggac tgcccttttgc ttcaatttgt 2400
 tacttgatcg ctatgttgst ctcgtaagat ataatatggc cgtccccccc ctacggagtt 2460
 cgatggaaatg ataagcaaataccaaacttag ccaagcttcg aagccatgc tttagggta 2520
 gatcgtglat ctgtcttgcc tggtagtatt acagcactgg agtagctgtc ctcattcgga 2580
 tccttaaaag ctcgaggctt aaatcttcta accccacaca ccgattttttt ttcacagag 2639

<210> 2

<211> 971

<212> DNA

<213> Lentinula edodes

<400> 2

ggaaattcgaa tgaactatcg cgataaataaa ataatgtcct cgttgtgtt atgtgtatg 60

ttggttttt agcgggtgaa gacaggttagc gctgagccctg gccattaatg gagaatgatt 120

cggtactcaa attgacatac atacctctag accggtggta caccatgtga gcaaggcgat 180

atttctgecg gttctaatcc actcagatgc tgcgcgcga tccccaggca tgtgttcaat 240

acacagctca caccatccgc ggctctcctt ttgcgttatca aggaatcgt tacggccatt 300

ttgaatcgga aagaaaatca cgcacgtagg ggtgtcaact actgcagttgg ttgcaaaaag 360

caagctcatg caagcgaggg taaagacata agtccaacga gccattggag tgctggata 420

tgataggata ggataggata gttaacttat actggcttagc tccgattgtc gggtaagtgg 480

gaagggagaa ctgacgggaa cgagtgtatgg agagaaaagac gagtctccac agcagttttt 540

ataacctgtt tgtgactaac tgtacatgtt gccaatctcc cgcataactg tatacataag 600

tattagcaaa tctttccatc aaagtggaaac cgtgacgggg ctactaattt tgctatgg 660

ccgcggata atgtacgaac gcactgacca gtaaatcacc acagtatcgaa ggtgcacacct 720

ggtgcaacaa ggcgcacac cgtcctgttc cattccatct ttgtaccata cccatttctc 780

ttgagataga tatccctgtgg ttcttgagtt tagagtacaa acagctcgga agttcattca 840

tggataaaagt ctttcaatct cegttcgacg caggagcgcc gctccccgt gatcattgt 900

tcatcttgc taatccgtcg ggaagggtgt aaaggagggtg tatataagga cggcagaaga 960

ggccagaagc t 971

<210> 3

<211> 2050

<212> DNA

<213> Lentinula edodes

<220>

<221> CDS

<222> (21)..(1874)

<400> 3

tttcacaga gttcattttag atg tct cat tat ctt gtc act ggc gca act gga 53
 Met Ser His Tyr Leu Val Thr Gly Ala Thr Gly
 1 5 10

gga tca acc tct ggg gca gca ccc aat cgt ctc gaa att aat gat 101
 Gly Ser Thr Ser Gly Ala Ala Ala Pro Asn Arg Leu Glu Ile Asn Asp
 15 20 25

ttc gtc aaa caa gaa gac cag ttt tct ctc tat att cag gct ttg caa 149
 Phe Val Lys Gln Glu Asp Gln Phe Ser Leu Tyr Ile Gln Ala Leu Gln
 30 35 40

tac att tat tca agt aaa agc caa gac gat att gac tcc ttc ttc caa 197
 Tyr Ile Tyr Ser Ser Lys Ser Gln Asp Asp Ile Asp Ser Phe Phe Gln
 45 50 55

atc gga ggg atc cat ggc ctt ccg tat gtc cct tgg gac ggc gca gga 245
 Ile Gly Gly Ile His Gly Leu Pro Tyr Val Pro Trp Asp Gly Ala Gly
 60 65 70 75

aat aag cca gta gac act gac gcc tgg gag gga tat tgc act cat ggc 293
 Asn Lys Pro Val Asp Thr Asp Ala Trp Glu Gly Tyr Cys Thr His Gly
 80 85 90

agc gtg tta ttt cca acc ttc cac cgt ccg tat gtt cta ctc atc gag 341
 Ser Val Leu Phe Pro Thr Phe His Arg Pro Tyr Val Leu Leu Ile Glu
 95 100 105

caa gca atc cag gct gcg gcc gtc gat atc gcc gca aca tac atc gta 389
 Gln Ala Ile Gln Ala Ala Ala Val Asp Ile Ala Ala Thr Tyr Ile Val
 110 115 120

gat	aga	gtc	cgt	tac	cag	gac	gcc	gcg	ttg	aat	cta	cgt	cag	cca	tac		437
Asp	Arg	Ala	Arg	Tyr	Gln	Asp	Ala	Ala	Leu	Asn	Leu	Arg	Gln	Pro	Tyr		
125						130					135						
tgg	gat	tgg	gcc	cga	aac	cca	gtt	cct	ccg	ccg	gaa	gta	ata	tct	ctg		485
Trp	Asp	Trp	Ala	Arg	Asn	Pro	Val	Pro	Pro	Pro	Glu	Val	Ile	Ser	Leu		
140						145					150				155		
gac	gag	gtt	acc	atc	gtt	aac	cca	agc	gga	gag	aaa	atc	tct	gtt	ccc		533
Asp	Glu	Val	Thr	Ile	Val	Asn	Pro	Ser	Gly	Glu	Lys	Ile	Ser	Val	Pro		
						160					165				170		
aac	cct	ctc	cga	cgt	tat	aca	ttc	cac	ccc	ata	gat	ccg	tcc	ttc	cct		581
Asn	Pro	Leu	Arg	Arg	Tyr	Thr	Phe	His	Pro	Ile	Asp	Pro	Ser	Phe	Pro		
						175					180				185		
gaa	cca	tat	cag	tct	tgg	tcg	act	act	ctt	cga	cat	cct	ttg	tcc	gat		629
Glu	Pro	Tyr	Gln	Ser	Trp	Ser	Thr	Thr	Leu	Arg	His	Pro	Leu	Ser	Asp		
						190					195				200		
gat	gcc	aat	gca	tcg	gac	aat	gtt	cca	gaa	ttg	aaa	gcg	acg	ttg	aga		677
Asp	Ala	Asn	Ala	Ser	Asp	Asn	Val	Pro	Glu	Leu	Lys	Ala	Thr	Leu	Arg		
						205					210				215		
agt	gtc	ccc	caa	ctc	aag	acc	aag	acg	tac	aac	ctt	ctg	acg	cga		725	
Ser	Ala	Gly	Pro	Gln	Leu	Lys	Thr	Lys	Thr	Tyr	Asn	Leu	Leu	Thr	Arg		
						220					225				230		235
gtt	cat	aca	tgg	ccg	gcf	ttc	agt	aac	cat	acg	ccc	gac	gat	gga	ggg		733
Val	His	Thr	Trp	Pro	Ala	Phe	Ser	Asn	His	Thr	Pro	Asp	Asp	Gly	Gly		
						240					245				250		
agt	acc	agc	aat	agt	ctt	gaa	ggt	atc	cac	gac	agt	gtc	cac	gtc	gat		821
Ser	Thr	Ser	Asn	Ser	Leu	Glu	Gly	Ile	His	Asp	Ser	Val	His	Val	Asp		
						255					260				265		
gtt	ggt	gga	aac	ggg	caa	atg	tca	gat	cct	tca	gta	gca	gga	ttc	gat		869
Val	Gly	Gly	Asn	Gly	Gln	Met	Ser	Asp	Pro	Ser	Val	Ala	Gly	Phe	Asp		
						270					275				280		
ccc	att	ttc	ttt	atg	cac	cat	gcc	cag	gtt	gat	cgt	ctg	ctt	tca	ttg		917
Pro	Ile	Phe	Phe	Met	His	His	Ala	Gln	Val	Asp	Arg	Leu	Leu	Ser	Leu		
						285					290				295		
tgg	tct	gca	ttg	aat	ccg	agg	gtg	att	acc	gac	gga	cct	tct	ggc		965	
Trp	Ser	Ala	Leu	Asn	Pro	Arg	Val	Trp	Ile	Thr	Asp	Gly	Pro	Ser	Gly		
						300					305				310		315
gat	ggg	aca	tgg	act	atc	cct	ccc	gac	act	gta	gtt	gga	aag	gat	act		1013

Asp Gly Thr Trp Thr Ile Pro Pro Asp Thr Val Val Gly Lys Asp Thr			
320	325	330	
gat ctt act ccg ttc tgg aac acc cag tca tcg tat tgg att tct gcc 1061			
Asp Leu Thr Pro Phe Trp Asn Thr Gln Ser Ser Tyr Trp Ile Ser Ala			
335	340	345	
aat gtg acc gat acg tcc aag atg gga tat aca tat cca gaa ttt aac 1109			
Asn Val Thr Asp Thr Ser Lys Met Gly Tyr Thr Tyr Pro Glu Phe Asn			
350	355	360	
aat ctc gat atg gga aat gaa gtt gca gtt cga tct gct ata gct gca 1157			
Asn Leu Asp Met Gly Asn Glu Val Ala Val Arg Ser Ala Ile Ala Ala			
365	370	375	
caa gtt aac aag ctc tat ggt gga cca ttc acg aaa ttc gcg gca gca 1205			
Gln Val Asn Lys Leu Tyr Gly Gly Pro Phe Thr Lys Phe Ala Ala Ala			
380	385	390	395
att caa caa cct tct tct caa act act gca gac gct tcc acg att ggc 1253			
Ile Gln Gln Pro Ser Ser Gln Thr Thr Ala Asp Ala Ser Thr Ile Gly			
400	405	410	
aat gtc aca aca gat gcc tct tcg cac ctg gta gac agc aaa atc aat 1301			
Asn Val Thr Ser Asp Ala Ser Ser His Leu Val Asp Ser Lys Ile Asn			
415	420	425	
ccg acg cca aat aga agc att gat gat gcc cct caa gta aaa ata gct 1349			
Pro Thr Pro Asn Arg Ser Ile Asp Asp Ala Pro Gln Val Lys Ile Ala			
430	435	440	
tcc act cta agg aac aac gaa caa aag gag ttt tgg gaa tgg act gcc 1397			
Ser Thr Leu Arg Asn Asn Glu Gln Lys Glu Phe Trp Glu Trp Thr Ala			
445	450	455	
cgt gtg cag gtc aag aag tac gaa ata ggt gga agc ttc aag gtc tta 1445			
Arg Val Gln Val Lys Lys Tyr Glu Ile Gly Gly Ser Phe Lys Val Leu			
460	465	470	475
ttc ttc tta ggc agt gtg ccc agt gat ccc aag gaa tgg gct act gat 1493			
Phe Phe Leu Gly Ser Val Pro Ser Asp Pro Lys Glu Trp Ala Thr Asp			
480	485	490	
ccc cat ttt gtc gga gca ttc cac ggg ttc gtg aat agc tct gcc gaa 1541			
Pro His Phe Val Gly Ala Phe His Gly Phe Val Asn Ser Ser Ala Glu			
495	500	505	
cga tgc gca aac tgt cgg cgt caa cag gat gtc gtt ctc gaa gga ttc 1589			
Arg Cys Ala Asn Cys Arg Arg Gln Gln Asp Val Val Leu Glu Gly Phe			
510	515	520	

gtg cat ctc aac gaa ggt att gcg aac att tcc aac ttg aac tca ttc 1637
 Val His Leu Asn Glu Gly Ile Ala Asn Ile Ser Asn Leu Asn Ser Phe
 525 530 535

gac cca atc gtt gtg gaa ccg tat ctt aaa gag aac ctc cac tgg cgt 1685
 Asp Pro Ile Val Val Glu Pro Tyr Leu Lys Asn Leu His Trp Arg
 540 545 550 555

gtg caa aag gta tcg ggc gag gta gtc aat ttg gat gca gcg aca tcc 1733
 Val Gln Lys Val Ser Gly Glu Val Val Asn Leu Asp Ala Ala Thr Ser
 560 565 570

ctg gaa gtc gta gtt gtc get acg cgt ttg gag ttg cct cct gga gag 1781
 Leu Glu Val Val Val Ala Thr Arg Leu Glu Leu Pro Pro Gly Glu
 575 580 585

atc ttc cca gta cct gca gag aca cac cac cat cac cat atc aca cat 1829
 Ile Phe Pro Val Pro Ala Glu Thr His His His His His Ile Thr His
 590 595 600

ggt cgt cct ggt ggt tct cgc cac agc gtc gca tct tca agc tcc 1874
 Gly Arg Pro Gly Gly Ser Arg His Ser Val Ala Ser Ser Ser Ser
 605 610 615

taatcagaca aagagtggaa ttcaaatgaa ctatcgcat aaataaataa tgtcctcggt 1934

gtcgatgt gtaatgttgg ttttttagc ggttgaagac aggttagcgt gagectggcc 1994

attaatggag aatgattcgg tactcaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 2050

<210> 4
<211> 618
<212> PRT
<213> Lentinula edodes

<400> 4
Met Ser His Tyr Leu Val Thr Gly Ala Thr Gly Gly Ser Thr Ser Gly
 1 5 10 15

Ala Ala Ala Pro Asn Arg Leu Glu Ile Asn Asp Phe Val Lys Gln Glu
 20 25 30

Asp Gln Phe Ser Leu Tyr Ile Gln Ala Leu Gln Tyr Ile Tyr Ser Ser
 35 40 45

Lys Ser Gln Asp Asp Ile Asp Ser Phe Phe Gln Ile Gly Gly Ile His
 50 55 60

Gly Leu Pro Tyr Val Pro Trp Asp Gly Ala Gly Asn Lys Pro Val Asp

65	70	75	80
Thr Asp Ala Trp Glu Gly Tyr Cys Thr His Gly Ser Val Leu Phe Pro			
85	90	95	
Thr Phe His Arg Pro Tyr Val Leu Leu Ile Glu Gln Ala Ile Gln Ala			
100	105	110	
Ala Ala Val Asp Ile Ala Ala Thr Tyr Ile Val Asp Arg Ala Arg Tyr			
115	120	125	
Gln Asp Ala Ala Leu Asn Leu Arg Gln Pro Tyr Trp Asp Trp Ala Arg			
130	135	140	
Asn Pro Val Pro Pro Pro Glu Val Ile Ser Leu Asp Glu Val Thr Ile			
145	150	155	160
Val Asn Pro Ser Gly Glu Lys Ile Ser Val Pro Asn Pro Leu Arg Arg			
165	170	175	
Tyr Thr Phe His Pro Ile Asp Pro Ser Phe Pro Glu Pro Tyr Gln Ser			
180	185	190	
Trp Ser Thr Thr Leu Arg His Pro Leu Ser Asp Asp Ala Asn Ala Ser			
195	200	205	
Asp Asn Val Pro Glu Leu Lys Ala Thr Leu Arg Ser Ala Gly Pro Gln			
210	215	220	
Leu Lys Thr Lys Thr Tyr Asn Leu Leu Thr Arg Val His Thr Trp Pro			
225	230	235	240
Ala Phe Ser Asn His Thr Pro Asp Asp Gly Gly Ser Thr Ser Asn Ser			
245	250	255	
Leu Glu Gly Ile His Asp Ser Val His Val Asp Val Gly Gly Asn Gly			
260	265	270	
Gln Met Ser Asp Pro Ser Val Ala Gly Phe Asp Pro Ile Phe Phe Met			
275	280	285	
His His Ala Gln Val Asp Arg Leu Leu Ser Leu Trp Ser Ala Leu Asn			
290	295	300	
Pro Arg Val Trp Ile Thr Asp Gly Pro Ser Gly Asp Gly Thr Trp Thr			
305	310	315	320
Ile Pro Pro Asp Thr Val Val Gly Lys Asp Thr Asp Leu Thr Pro Phe			
325	330	335	

Trp Asn Thr Gln Ser Ser Tyr Trp Ile Ser Ala Asn Val Thr Asp Thr
 340 345 350
 Ser Lys Met Gly Tyr Thr Tyr Pro Glu Phe Asn Asn Leu Asp Met Gly
 355 360 365
 Asn Glu Val Ala Val Arg Ser Ala Ile Ala Ala Gln Val Asn Lys Leu
 370 375 380
 Tyr Gly Pro Phe Thr Lys Phe Ala Ala Ala Ile Gln Gln Pro Ser
 385 390 395 400
 Ser Gln Thr Thr Ala Asp Ala Ser Thr Ile Gly Asn Val Thr Ser Asp
 405 410 415
 Ala Ser Ser His Leu Val Asp Ser Lys Ile Asn Pro Thr Pro Asn Arg
 420 425 430
 Ser Ile Asp Asp Ala Pro Gln Val Lys Ile Ala Ser Thr Leu Arg Asn
 435 440 445
 Asn Glu Gln Lys Glu Phe Trp Glu Trp Thr Ala Arg Val Gln Val Lys
 450 455 460
 Lys Tyr Glu Ile Gly Gly Ser Phe Lys Val Leu Phe Phe Leu Gly Ser
 465 470 475 480
 Val Pro Ser Asp Pro Lys Glu Trp Ala Thr Asp Pro His Phe Val Gly
 485 490 495
 Ala Phe His Gly Phe Val Asn Ser Ser Ala Glu Arg Cys Ala Asn Cys
 500 505 510
 Arg Arg Gln Gln Asp Val Val Leu Glu Gly Phe Val His Leu Asn Glu
 515 520 525
 Gly Ile Ala Asn Ile Ser Asn Leu Asn Ser Phe Asp Pro Ile Val Val
 530 535 540
 Glu Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Leu His Trp Arg Val Gln Lys Val Ser
 545 550 555 560
 Gly Glu Val Val Asn Leu Asp Ala Ala Thr Ser Leu Glu Val Val Val
 565 570 575
 Val Ala Thr Arg Leu Glu Leu Pro Pro Gly Glu Ile Phe Pro Val Pro
 580 585 590
 Ala Glu Thr His His His His Ile Thr His Gly Arg Pro Gly Gly
 595 600 605

Ser Arg His Ser Val Ala Ser Ser Ser Ser
 610 615

<210> 5

<211> 6290

<212> DNA

<213> Lentinula edodes

<400> 5

aatgtgaatt ccaaggctgt attccctcct atcgcgaa tcgttacct atccacccct 60

ttctcttcg atacgacgcc ggaagatagg caaacagctt taagagcgtt tcatgaaaca 120

gaagacgcta aggagatata tgagcactca ccggctggat ttagataggc gttatccgca 180

tcatctctag ttggatcc gagaaaattc cttgcgttga ttgtcttagc acagtacgac 240

ccgtacgtca ttaagttcg attgcttca agagataaca gtcgagaaat cgtttccag 300

gcaagaaatc caagattcaa cttctcggtt tatagaggaa tatcgagaa aaagtccgca 360

aggaatctt ccagagttcg tggcgtggc tggcacacaac catatttcac atgtttgttc 420

aatttgaaca gaggacgacg tgctgggag attactgcgc gagtttggg ggaaagtctg 480

ttcaaggta gccagcgatt cgtaaagatg tactgttaact gaatgaacga gtgcgtcat 540

agatttactt ggaagtacaa aggcaaaat ttggacgctt agacgaagca gtggactta 600

ctgttatctt gatatggatg tgtatgaatg gataccgtt caagttgaag agaaagcggtt 660

gcctaacttc agaattgaac gcagtcggac caagggcat tcggctccgg aatgccagac 720

tcgacgcacc accgagttcc cttcgacaa gccttgcgc aaagtgtta atgttagtct 780

ggaattccaa agagattta ttacacgacg agaatattat gtacattcga ttctccgtga 840

actaaccagg tgcactgtt catgtcacgt gtagggcggg tatctactat ctgcattcg 900

gatgaccgag gatgccactg ggatatcgt actaagcgat tcagccgtca tcgatggac 960

atgaatatgc atgaatattt aatcagcaaa atgaatcaac accccttgggt ctctcgctt 1020

ctcagaggca ttctgaggca acctctacgg aattttcat gttcggttta ccaccgtctc 1080

cgcagctgtt ctacctctga cataaaactt ttccccgttc ccaatgagac ctccacaccc 1140

ctcgagctt gataagcctt cagcgttatg gattcgattc cagttccgc ccccggttc 1200

ttctcgtttc ctaatgaatt tcctggacat gtcatacggtt acaagagcaa tctctctgaa 1260
 aaactatacc tataatttt accggcggtg taatcaggta gaatcagggtt gtagtaatgt 1320
 tcgaaaagtt caaccctagg tcttccctcc ccttctctcc catgcgtctg tcactgtcac 1380
 tcttacttct ctggaaagtaa cagatattgg aactgtgttag cagaaaacaa gtcgaacgga 1440
 catcacatac ctctcccttg ctgcgcacca aattttcccc ttctgttcta tcccggttgt 1500
 ctcaaatgtc ggcatcttgt tcctcgattt cgccggacaca tagcgctagt gctaaatccc 1560
 aatccttctt aggagcttc atcttcaact ctcataaaat aacacgttca aatcaaccaa 1620
 agcctggta tatcagacct ttcgttcgc catttcattt tgcattgttc cacatcctga 1680
 ctgggataca cggctgacga gataaggagc cggatggcac ttaagaagt cagattatat 1740
 cgactgcgtt gtaataagaa tagaggttag cagtgttagt ctatgtatgt ttccggatca 1800
 tcgtttcttc tcatttacac aatggtccta caaacgagca aagtgtactt accactggat 1860
 ttttgaacga atattttcc caaaaacaaat ttttttcca atttatataa ctttaggtga 1920
 cacaagtggt tggtggctt agtcaagatg cttgcacggc gttgaagcca ttttcgttga 1980
 taagtatgaa cccatagacg cggctcgaat tttcagtgcc ggtgtcaatg gagtaatct 2040
 cgctgttcgg gctacatagt tttagtagtt ggtgttaata ggcacataca attcaaggag 2100
 gcctaacaaa acactacttc gggAACCAAG gattattacc attgctcagg tgaaaggtag 2160
 atccgtacaa actcagcccg aatcttgcact aaaacacata ctgaagacag ccgaagaage 2220
 aatggaaatga atcttagtccc gttgggtttt acccttttt tctatcactc aatcgacgg 2280
 cagattccag aggccgacca atactgctaa gactgcacac agaggctgtt taaccgacat 2340
 gattctataca aacaaatctc agccactttc tccgtttctg tccggactgc ccttttttc 2400
 aatttggtagt ttgatcgta tgggttgcgtc gtaagatata atatggacgt ccccccccta 2460
 cggagttcga tggaagtata agcaaattgcc aacttagccca agcttcgaag gcaatgttta 2520
 gggggtagat cgtgtatctg tcttggctgt tagtattaca gactggagt agctgtgtc 2580
 attcggatcc ttaaaagctc gaggctaaa tcttctaaacc ccacacacccg atttggtttc 2640
 acagagttca tttagatgtc tcattatctt gtcactggcg caactggagg atcaacctct 2700

gggcagcag caccaatcg tctgaaatt aatgatttcg tcaaacaaga agaccagttt 2760
 tctctata ttcaaggctt gcgttaagtgc aaatcaggct gaatatcgcg gaactcggtt 2820
 attaattggc acatcatgaa tcagaataca tttattcaag taaaagccaa gacgatattg 2880
 actcccttcc caaaatcgga gggatccatg gcttccgtt tgcccttgg gacggcgcag 2940
 gaaataagcc agtagacact gacgcctggg agggatattg cactcatggc agegtttat 3000
 ttccaacctt ccaccgtccg tatgttctac tcatcgaggta aatcagattt ttttgcctaa 3060
 aactgtcgac actgactcat atttgttttg ctgcgttagc aagcaatcca ggctgeggcc 3120
 gtcgatatcg ccgcaacata catcgtagat agagctcggtt accaggacgc cgctgttaat 3180
 ctacgtcagc catactggga ttggcccgaa aacccagttt ctccgcggaa agtaatatct 3240
 ctggacgagg ttaccatcgta taacccaagc ggagagaaaa tctctgttcc caacccttc 3300
 cgacgttata cattccaccc catagatccg tccttcctg aaccatataca gtcttggcgtt 3360
 actactttc gacatccccc gtccgatgtat gccaatgcgtt cggacaatgtt tccagaattt 3420
 aaagcgtagt tttcaactgca tactcaaattt aatagcatgaa attcttacgtt tcattgcagg 3480
 acgtttagaa gtgttgtcc ccaactcaag accaagacgtt acaacccctt gacgcgagttt 3540
 catacatggc cggcgttcag taaccatacg cccgacgatg gagggagttt cagcaatgtt 3600
 cttgaaggta ttcacattgg tgttcaactgc aaacacgagg cttatggctt ccacaaggta 3660
 tccacgacag tgtccacgtc gatgttgtt gaaacggca aatgtcagat ctttcgttag 3720
 caggttagtc atttttgtta cttttcgcgtt ctgaaataatc gacatacctt cggcaggattt 3780
 cgatcccatt ttctttatgc accatgccca gttgtatgtt ctgtttcat tttgtgttc 3840
 attgaatccg aggtgtggaa ttaccgacgg accttctggc gatggacat ggactatccc 3900
 tcccgacact gtatgtggaa aggatactgg tactttcacg ctcgattgtt acggatggac 3960
 ccgaagtcaa ctaatcatct tataatatcc agatcttactt ccgttctggaa acacccagtc 4020
 atcgatattgg atttttcgttcaat atgtgaccga tacgttcaag atggatataatccatccaga 4080
 atttaacaat ctgcgtatgg gaaatgaatgtt tgcgttcaat tctgttatgtt ctgcacaatgtt 4140
 taacaagctc tatgttgttccatccacgaa attcgccggaa gcaattcaac aaccccttc 4200

tcaaactact gcagacgett ccacgattgg caatgtcaca agcgatgcct cttegcacct 4260
 gtagacagc aaaatcaatc cgacgccaaa tagaaggcatt gatgatgccct ctaagtaaa 4320
 aatagcttcc actctaagga acaacgaaca aaaggagttt tgsgaatgga ctgcccgtgt 4380
 gcaggtaag aagtacgaaa taggtggaaag cttcaaggtc ttattcttct taggcagtgt 4440
 gcccagtgtat cccaaggaat ggctactga tccccatttt gtccggacat tccacggtt 4500
 cgtgaatagg ttagctgcaa ttcatttgc gcaatacttc aatttataat ttggctctgt 4560
 ttatgtatca cagctctgcc gaacgatgctg caaactgtcg gctcaacag gatgtcggtc 4620
 tcgaaggatt cgtcatctc aacgaaggta ttgcgaacat ttccaacttg aactcattcg 4680
 acccaatcgt tgtggAACCG tatcttaaag agaacctcca ctggcgtgtg caaaaggcaa 4740
 gatttgattt tttctctgct tcacaatgcc atggatcaac ataacttca ggtatcggtc 4800
 gaggttagtca atttggatgc agcgacatcc ctggaaagtcg tagttgtcgc tacgcgttg 4860
 gagttgcctc ctggagagat ctcccgatc cctgcagaga cacaccacca tcaccatatac 4920
 acacatggc gtcctgggtt ttctcgccac agcgatgcat cttcaaggctc ctaatcagac 4980
 aaagagtggaa attcaatga actatcgca taaataaata atgtccttgt tgtgtstatg 5040
 tgtaatgttgc tttttttagc ggttgaagac agtagcgtt gggctggcc attaatggag 5100
 aatgattcgg tactcaaatt gacatacata cctctagacc ggtggcacatc catgtgagca 5160
 aggccatatt tctggcggtt ctaatttact cagatgtgc ggcgcacatcc ccaggcatgt 5220
 gttcaataca cagctcacac catccggc ttccttttc gctatcaagg aatcagttac 5280
 ggccatttttgc aatcgaaag aaaatcacgc acgttagggag tgcaactact gcagtgggtt 5340
 caaaaaagcaa gtcatgcaa gcgagggtaa agacataagt ccaacgagcc attggagtgc 5400
 tggatatga taggatagga taggatagtt aacttatact ggcttagctcc gattgctggg 5460
 taagtggaa gggagaactg acggggacga gtgatggaga gaaagacgag tctccacagc 5520
 agttttata accttagttgt gactaactgt acatgttgc aatctccgc ataactgtat 5580
 acataagtat tagcaaatttct ttccatcaaa gtgaaaccgt gacggggctt ctaattatgc 5640
 tatggaccgc cgstataatgc tacgaacgca ctgaccagta aatcaccacaca gtatcgaggt 5700

gcaacctggc gcaacaaggc gcagcacccgt cctgttccat tccatcttg taccataccc 5760
 atttctcttg agatagatat cctgtggttc ttgagtttag agtacaaaca gctcgaaagt 5820
 tcattcatgg ataaagtctt tcaatctccg ttgcacgeag gagcggcgct ccccggtat 5880
 cattgtatca tcttgactaa ttctgtggga aggtgtaaaa ggagggttat ataaggacgg 5940
 cagaagaggg cagaagctggc gcagaagtga catagaaaat ggcgctccaa atggcgaaa 6000
 tcaggaatta atctgtgtac attggaagat aagataagat catatgccat aagatcaaca 6060
 tttattgact ccgatctgtat tgattgaaaa acctcagaac tgcaaaagag cctcttttt 6120
 ccagcactct tatcttcata tacagtgtcg cctcccccc ctcttacagc gaagttcccc 6180
 accatgaacg acaaattttt ggaggatacg agcgatcctg gcttaccgac cactattgtt 6240
 cccctactg cagatttga tggctttcc tttggtgatc ggagtttagta 6290

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>

<221> Degenerate

<222> (11)

<223> "n" is a, t, c or g

<220>

<221> Degenerate

<222> (14)

<223> "n" is a, t, c or g

<400> 6

tycarathgg nggnathcay gg

22

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>

<221> Degenerate

<222> (2)

<223> "n" is a, t, c or g

<220>

<221> Degenerate

<222> (8)

<223> "n" is a, t, c or g

<220>

<221> Degenerate

<222> (14)

<223> "n" is a, t, c or g

<400> 7

rnckrtenac ytgngrtgr tg

22

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 8

gcgcaggaaa taagccagta gacac

25

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 9

gcgtggtgca taaagaaaaat

20

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 10

attccaagcc tgtattccct cctatcg

27

<210> 11
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 11
ctctgtgaaa acaaatcggt gtgtgggg

28

<210> 12
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 12
ggaattcgaat tgaactatcg cgataaataaa ataatgt

37

<210> 13
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 13
agcttctgcc ctttctgcc gtcctta

27

【0097】

【配列表フリーテキスト】

【配列番号6】 プライマー。第11塩基及び第14塩基のnは、a、t、c又はgである。

【配列番号7】 プライマー。第2塩基、第8塩基及び第14塩基のnは、a、t、c又はgである。

【配列番号8~13】 プライマー。

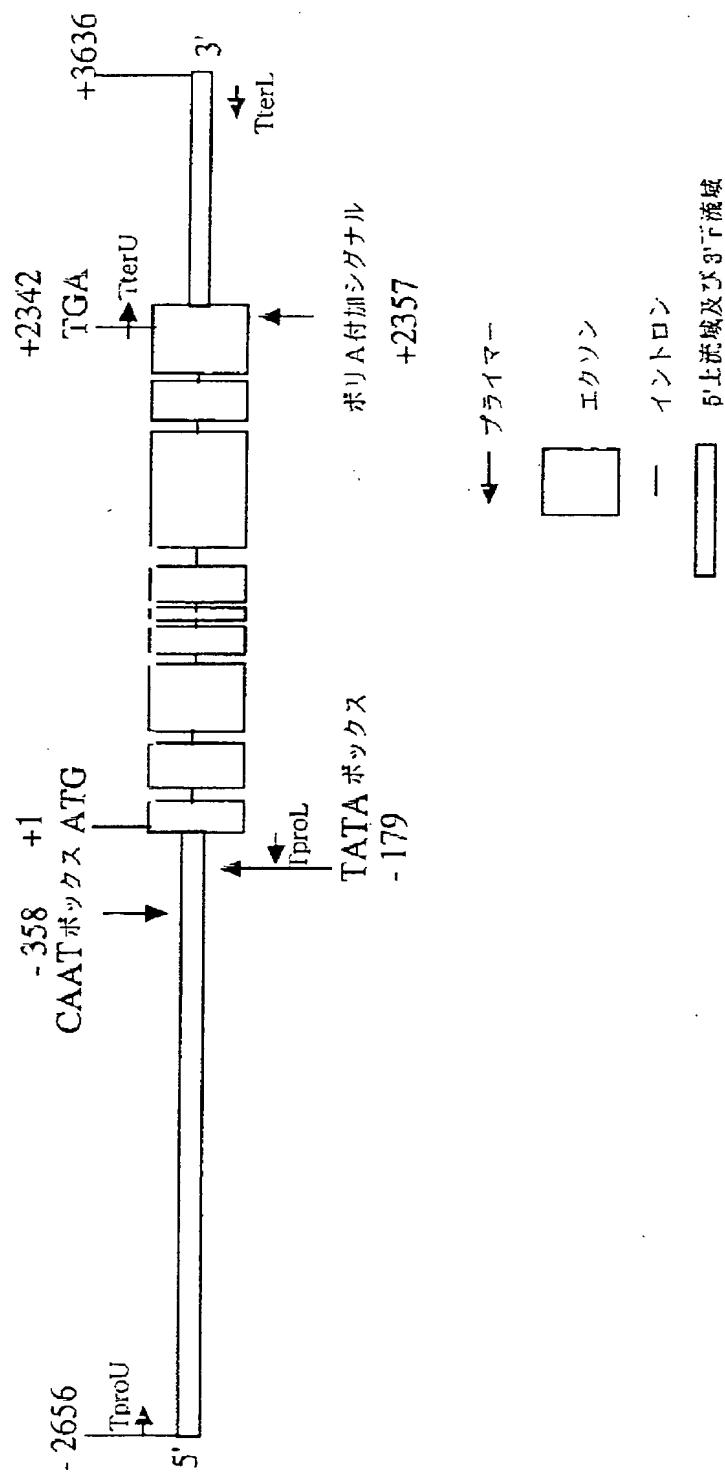
【0098】

【図面の簡単な説明】

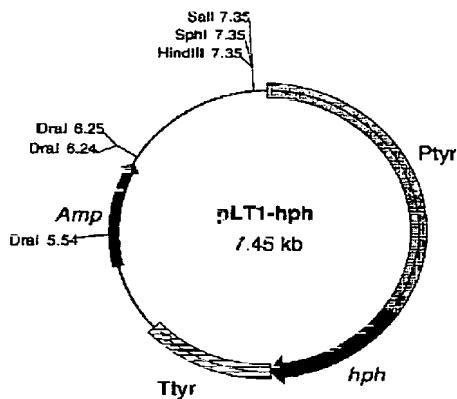
【図1】シイタケチロシナーゼ遺伝子の構造を表わす模式図である。

【図2】本発明の遺伝子発現ベクターpLT-hphの構造を表わす模式図である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7	識別記号	F I	(参考)
C 12 N 5/10		C 12 N 5/00	A

(72) 発明者 大川 久美子
岩手県北上市町分1-284-1 プレステ
ージ I I 205号

(72) 発明者 神田 勝弘
岩手県盛岡市西青山1-7 青山アパート
1-201号

(72) 発明者 八重樫 香
岩手県宮古市宮町3-6-16 ディアス宮
町A-201

(72) 発明者 江井 仁
岩手県北上市新穀町1丁目6番地27
F ターム(参考) 2B030 AA05 AD08 CA17 CA19 CB03
4B024 AA20 BA02 BA03 BA08 CA04
DA11 EA04 FA02 FA07 GA14
GA19 HA01 HA14
4B065 AA26Y AA71X AB01 AC14
BA03 BA25 CA24 CA28